



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

①⑫ **Offenlegungsschrift**
①⑩ **DE 198 46 271 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/569

②① Aktenzeichen: 198 46 271.9
②② Anmeldetag: 8. 10. 1998
④③ Offenlegungstag: 13. 4. 2000

DE 198 46 271 A 1

⑦① Anmelder:
Viragen Virus-Antigene GmbH, 70193 Stuttgart, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Ruff, Beier und Partner, 70173
Stuttgart

⑦② Erfinder:
Terletskaia-Ladwig, Elena, Dr., 70193 Stuttgart, DE;
Metzger, Christoph, Dr., 89077 Ulm, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE	39 39 200 A1
WO	89 09 790 A1
WO	82 02 774 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zum Nachweis enteroviraler Antigene und Testkit

⑤⑦ Die Erfindung umfaßt ein Verfahren zum schnellen und einfachen Nachweis enteroviraler Antigene sowie Testkits, die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet sind. Das Verfahren beruht auf der spezifischen Bindung von enteroviralen Antigenen an Fängerantikörpern unter Ausbildung eines Komplexes und dem Nachweis dieses Komplexes durch Bindung weiterer Antikörper (Detektionsantikörper). Die erfindungsgemäßen Testkits umfassen einen Träger mit fixierten Antikörpern, wobei die Antikörper gegen mindestens eine gruppenspezifische Determinante von Enteroviren gerichtet sind. Der Träger für die Antikörper kann als Mikrotiterplatte oder als Teststreifen (Dip Stick) ausgebildet sein.

DE 198 46 271 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis enteroviraler Antigene sowie Testkits, die sich für die Durchführung eines Enterovirus-Nachweises besonders eignen.

Enteroviren sind eine sehr verbreitete Ursache für Infektionen, insbesondere bei Neugeborenen und Kindern. Der antigenisch variable Genus Enterovirus, der der Familie Picornaviridae angehört, umfaßt 67 bekannte Serotypen: die Polioviren Typ 1 bis 3 sowie die Non-Poliovirus Enteroviren Cocksackievirus A (23 Serotypen), Cocksackievirus B (6 Serotypen), ECHO-Virus (31 Serotypen) und die nummerierten Enteroviren 68 bis 71. Eine Infektion mit Non-Poliovirus Enteroviren geht mit einem weiten Spektrum klinischer Krankheitsbilder einher. Meist führen die Infektionen zu einer milden fieberigen oder influenzaähnlichen Erkrankung, bei schweren Verläufen kann es allerdings zu aseptischer Meningitis, Enzephalitis, paralytischen Symptomen oder akuter und chronischer Myocarditis kommen. Bei Neugeborenen können schwerste, gelegentlich tödlich verlaufende, septische Krankheitsbilder mit Meningitis, Myocarditis, Pankreatitis und Hepatitis auftreten.

Die Infektion geht mit einer wechselnd ausgeprägten zytotidalen Virusvermehrung einher, wobei diese zunächst in Epithelzellen des Nasen-Rachen-Raumes, bzw. Magen-Darm-Traktes und in den regionalen Lymphknoten stattfindet. Erst danach kann es zu einer Ausbreitung der Viren in verschiedenen Organen, wie dem Zentralen Nervensystem, der Skelettmuskulatur, dem Herzen oder der Leber kommen.

Die klinischen Verläufe einer enteroviralen Infektion sind oft nicht von den Verläufen anderer viraler oder bakterieller Infektionen zu unterscheiden. Um vor allen Dingen eine unnötige und nicht sinnvolle antibiotische Behandlung zu vermeiden, wird daher ein aussagekräftiges und schnelles Verfahren zur Differentialdiagnose benötigt.

Das bisherige Mittel der Wahl zur Diagnose von enteroviralen Infektionen ist der Virusnachweis nach Virusisolierung aus Zellkulturen, die mit klinischen Materialien, wie Nasen- und Rachenabstrichen, Rektalabstrichen, Stuhl, Bläscheninhalt und Liquor beimpft wurden. Da sich nicht alle Enteroviren in ein und derselben Zelllinie vermehren, müssen jeweils mehrere Zelllinien parallel beimpft werden. Die Inkubationsdauer der beimpften Zellkulturen kann bis zu 10 Tage in Anspruch nehmen. Die Serotypisierung eines Virusisolats wird dann mittels Neutralisationstests durchgeführt. Die Methode kann nur in speziell ausgerüsteten Laboratorien durchgeführt werden und ist ein sehr zeit- und kostenintensives Verfahren zum Nachweis von Enteroviren.

Eine weitere Möglichkeit zur Diagnose von enteroviralen Infektionen bietet der Nukleinsäurenachweis mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Diese sehr empfindliche Methode, die auf der Amplifikation spezifischer, konservierter, enteroviraler Genomsequenzen beruht, birgt jedoch durch ihre Kontaminationsanfälligkeit die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen. Die Methode bedarf einer speziellen Ausrüstung des durchführenden Labors und ist mit sehr hohen Kosten verbunden.

Aufgrund der bestehenden Situation der sehr langen und kostenaufwendigen Diagnose von enteroviralen Infektionen stellt sich die Erfindung insbesondere die Aufgabe, ein schnelles und zusätzlich kostengünstiges Verfahren, dessen Durchführung nicht auf Speziallaboratorien beschränkt ist, zu entwickeln sowie einen Testkit zur Verfügung zu stellen, der einen leicht handhabbaren Nachweis von Enteroviren ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und durch den Kit mit den Merkmalen des Anspruchs 7. Besondere Ausführungen die-

ses Verfahrens und dieses Kits sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 6 bzw. 8 bis 22 beschrieben. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

Das Verfahren des direkten Antigennachweises nach Anspruch 1 basiert auf dem Prinzip der spezifischen Bindung eines Antigens an immobilisierte Antikörper (Fängerantikörper) durch Ausbildung eines Antigen-Antikörperkomplexes. Hierbei kommen Antikörper zur Verwendung, die gegen gruppenspezifische Determinanten von Enteroviren gerichtet sind. Die Detektion des so geformten Antikörper-Antigenkomplexes wird unter Bindung von Antikörpern (Detektionsantikörper) durchgeführt.

Die für das Verfahren des erfindungsgemäßen Enterovirus-Nachweises eingesetzten Antikörper erfüllen in der Regel die Voraussetzung einer hohen Genuspezifität für den Genus Enterovirus sowie einer hohen Kreuzreaktivität zwischen den Vertretern dieses Genus. Es kommen dafür monoklonale Antikörper oder auch polyklonale Antikörper in Frage, die vorzugsweise an einer Festphase fixiert, d. h. immobilisiert werden (erste Antikörper).

Die hochspezifische Wechselwirkung von Antikörper und Antigen bewirkt, daß nach Beschicken beispielsweise der Festphase, an welcher die spezifischen Antikörper fixiert sind, mit der klinischen Probe, welche auf die Anwesenheit von Enteroviren, d. h. auf Anwesenheit von enteroviralen Antigenen, getestet werden soll, die enteroviralen Antigene zurückgehalten werden. An diese enteroviralen Antigene binden weitere Antikörper (zweite Antikörper), die bezüglich der Genuspezifität und der Kreuzreaktivität in der Regel im wesentlichen die gleichen Erfordernisse wie die ersten Antikörper erfüllen, jedoch gegen eine andere gruppenspezifische Determinante von Enteroviren gerichtet sind. Es ist weiterhin auch möglich, durch die Verwendung von ersten und/oder zweiten Antikörpern, welche spezifisch gegen bestimmte Untergruppen der Enteroviren gerichtet sind, innerhalb der Gruppe Enterovirus zu differenzieren.

Bei bevorzugten Ausführungsformen erfolgt die Detektion des an der Festphase zurückgehaltenen Antigens durch die Markierung des zweiten Antikörpers, welcher z. B. mit Meerrettich-Peroxidase (POD) oder mit Biotin konjugiert ist. Im Fall der Markierung mit einem Enzym wie POD erfolgt der Nachweis direkt in Form einer Farbreaktion. Bei Verwendung von Biotin als Markierung wird der Antikörper-Antigenkomplex durch den Einsatz von POD-markiertem Streptavidin wiederum durch eine Farbreaktion nachgewiesen, da Streptavidin einen stabilen Komplex mit Biotin ausbildet. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird kolloidales Gold als Markierung für den zweiten Antikörper eingesetzt. Weiterhin ist es bei anderen bevorzugten Ausführungsformen möglich, die Bindung des zweiten Antikörpers an den Antikörper-Antigenkomplex durch die Bindung eines dritten, markierten Antikörpers nachzuweisen, der spezifisch gegen den zweiten Antikörper gerichtet ist. Wenn es sich bei dem zweiten Antikörper beispielsweise um einen polyklonalen Antikörper aus einem Kaninchen handelt, ist es möglich, einen dritten Antikörper zu verwenden, der spezifisch gegen Antikörper aus Kaninchen generiert wurde. Für die Farbreaktion, die durch das Markierungsenzym POD katalysiert wird, kann beispielsweise das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt werden, welches nach erfolgter Reaktion zu einer blauen Färbung des Reaktionsgemisches führt. Durch Zugabe von Stop-Reagenz, wie z. B. Schwefelsäure, erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Eine photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Weiter umfaßt die Erfindung Testkits zum Nachweis enteroviraler Antigene, die eine schnelle und einfache Durch-

führung insbesondere des genannten Verfahrens ermöglichen, sowie kostengünstig und ohne nennenswerten apparativen Aufwand durchgeführt werden können. Den Testkits liegt die spezifische Interaktion des enteroviralen Antigens mit einem Antikörper, der gegen eine gruppenspezifische Determinante von Enteroviren gerichtet ist, zu Grunde.

Die für die Testkits eingesetzten Antikörper weisen in der Regel eine hohe Gruppenspezifität für Enteroviren und eine hohe Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Vertretern der Enteroviren auf. Entsprechend der obigen Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen dafür monoklonale, Mischungen verschiedener monoklonaler oder auch polyklonale Antikörper in Frage. Alle Antikörper liegen bevorzugt in gereinigter Form vor, um unspezifische Wechselwirkungen der enteroviralen Antigene mit anderen Stoffen auszuschließen.

Zur Detektion der Interaktion von enteroviralem Antigen mit dem (Fänger-)Antikörper umfaßt der erfindungsgemäße Testkit vorzugsweise mindestens einen weiteren (Detektions-)Antikörper. Bezüglich dieser vorstehend als zweite und dritte Antikörper bezeichneten Detektionsantikörper und deren Markierung wird ausdrücklich auf die bisherige Beschreibung verwiesen.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform des Testkits wird der gegen enterovirale gruppenspezifische Determinanten gerichtete Antikörper (erster Antikörper) auf einer Festphase, bevorzugt einer Mikrotiterplatte, immobilisiert. Im letzteren Fall werden hierfür vorzugsweise 96-Loch Mikrotiterplatten eingesetzt, da diese Platten einen hohen Probendurchsatz gewährleisten und viele gebräuchliche Instrumente, wie z. B. Mehrkanalpipetten, auf den Einsatz mit 96-Loch Mikrotiterplatten abgestimmt sind. Diese 96-Loch Mikrotiterplatten können aus zwölf Mikrotiterstreifen mit jeweils acht Vertiefungen (wells) bestehen.

Die Immobilisierung der Antikörper auf Platten kann mit Hilfe von Adsorption durch Verwendung geeigneter, vorbeschichteter Platten durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit der Immobilisierung ist die kovalente Verknüpfung der Antikörper mit einer Platte, die beispielsweise eine Hydrazid-Oberfläche aufweist. Eine bevorzugte Ausführungsform der Antikörper-Immobilisierung an Platten besteht jedoch in der Verwendung von mit Protein G beschichteten Platten, da hier die Antikörper über ihre nicht-antigenbindenden Komponenten fixiert werden und so die größte Ausbeute an reaktiven, d. h. antigenbindenden Antikörpern erlangt werden kann.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform des Testkits ist der gegen gruppenspezifische Determinanten von Enteroviren gerichtete Antikörper auf einer Membran, vorzugsweise einer Nitrozellulose-Membran, immobilisiert.

Diese Membran ist insbesondere Bestandteil eines Teststreifens (Dip Stick), welcher eine sehr schnelle Durchführung des Tests auf enterovirale Antigene ermöglicht. Weiterhin hat die Verwendung von Teststreifen den entscheidenden Vorteil, daß keine weiteren Instrumente, wie z. B. ein Photometer, benötigt werden.

Bei dem Testkit, insbesondere bei der Ausführung als Teststreifen, ist vorzugsweise eine Funktionskontrolle vorgesehen, um falsch negative Ergebnisse sicher ausschließen zu können. Hierfür wird vorzugsweise ein zusätzlicher Antikörper auf dem Teststreifen fixiert, welcher den Antikörper bindet, der gegen das enterovirale Antigen gerichtet ist, wie aus der noch folgenden Figurenbeschreibung deutlich wird.

Die beschriebenen Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen in Verbindung mit den Unteransprüchen und den Zeichnungen. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder zu

mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 Schematische Darstellung von auf einer Festphase fixierten Antikörpern und der Wechselwirkungen mit Enterovirus-Antigen und weiteren Antikörpern,

Fig. 2 schematische Darstellung des Aufbaus eines Enterovirus-Teststreifens.

Im unteren Teil von **Fig. 1** ist die Festphase **1** dargestellt, an der der erste Antikörper **2** fixiert ist. Dieser (Fänger-)Antikörper ist gegen gruppenspezifische Determinanten von Enteroviren **3** gerichtet. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Fixierung der Antikörper **2** an der Festphase **1** sind im später folgenden Beispiel näher erläutert. Die durch die Wechselwirkung mit dem fixierten Antikörper **2** zurückgehaltenen enteroviralen Antigene **3** sind zusätzlich von einem weiteren, zweiten Antikörper **4** gebunden. Wenn dieser Antikörper **4**, wie im linken Bildteil dargestellt, mit einem Enzym **5**, wie beispielsweise Peroxidase, markiert ist, so kann der ausgebildete Komplex von fixiertem Antikörper **2**, Antigen **3** und zweitem Antikörper **4** durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden, die durch das Enzym **5** katalysiert wird. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises ist im rechten Bildteil dargestellt. Der zweite Antikörper **4** ist mit Biotin **6** konjugiert. Dieses Biotin **6** kann einen stabilen Komplex mit Streptavidin **7** ausbilden. Ist das Streptavidin **7** mit einem Enzym **8**, beispielsweise Peroxidase, konjugiert, kann der gebildete Komplex durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden. Weiterhin kann der Nachweis dadurch erfolgen, daß der zweite Antikörper **4** von einem dritten Antikörper gebunden wird, welcher spezifisch gegen den zweiten Antikörper **4** gerichtet ist und welcher eine Markierung, beispielsweise Peroxidase, trägt.

Fig. 2 zeigt schematisch den Aufbau einer bevorzugten Ausführungsform des Testkits. Es handelt sich dabei um einen Teststreifen (Dip Stick), der unter Nutzung üblicher Komponenten aufgebaut ist. Das Trägermaterial des Teststreifens **11** besteht aus einem etwa 9 cm langen und 0,5 cm breiten Kunststoffstreifen, der mit saugfähigen Membranen versehen ist. Jeweils etwa 2 cm von den beiden Enden **12** und **13** des Streifens entfernt sind über dessen Breite saugfähige Komponenten **15** und **15a** angeordnet, die jeweils eine Länge von etwa 1,5 cm aufweisen. Oberhalb der unteren Saugkomponente **15** ist ein Abschnitt **14** vorgesehen, der einen Maus-Antikörper **16** trägt, welcher spezifisch gegen enterovirale Antigene gerichtet ist und eine Markierung aus kolloidalem Gold besitzt. Der Bereich zwischen dem Abschnitt **14** und der oberen Saugkomponente **15a** weist eine Nitrozellulosemembran auf, auf welcher im Abstand von etwa 2 cm zwei Banden **17** und **18** voneinander verschiedener Antikörper **19**, **20** von etwa 0,1 cm Breite aufgebracht sind. Der Antikörper **19** der Bande **17** ist spezifisch gegen enterovirale Antigene gerichtet und entspricht bezugnehmend auf die vorhergehende Beschreibung dem ersten Antikörper. Der Antikörper **20** der Bande **18** dient der Funktionskontrolle des Teststreifens und ist spezifisch gegen die Antikörper **16** aus der Maus gerichtet.

Im folgenden ist die Funktionsweise des Teststreifens erläutert: Nach dem Eintauchen des unteren Endes **12** des Teststreifens in eine klinische Probe **21** werden die löslichen Komponenten infolge der Kapillarkräfte entlang des Teststreifens in Richtung der saugfähigen Komponente **15** emporgezogen. Die enteroviralen Antigene aus der klinischen Probe **21** kommen auf diese Weise in Kontakt mit Antikörpern **16** des Abschnitts **14**, so daß sich ggf. ein stabiler Antigen-Antikörperkomplex ausbilden kann. Der aus enteroviralen Antigenen aus der klinischen Probe **21** und den spezifischen, markierten Antikörpern **16** gebildete Komplex erreicht infolge der Kapillarkräfte die Bande **17** des Teststreifens.

fens und wird von den dort immobilisierten Antikörpern **19** festgehalten. In diesem Fall verfärbt sich die Bande **17** violett. Oberhalb dieser Bande **17** befindet sich die Bande **18** mit dem immobilisierten Antikörper **20**, welcher gegen Antikörper aus der Maus gerichtet ist. Dieser Antikörper **20** bindet den spezifischen Antikörper **16** und führt zu einer ebenfalls violetten Verfärbung der Bande **18**. Diese letztere Verfärbung ist unabhängig davon, ob enterovirales Antigen gebunden wurde und dient somit als Funktionskontrolle.

Nachfolgend ist eine mögliche Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit der Bereitstellung der verschiedenen dafür benötigten Komponenten beschrieben.

1. Herstellung von Reagenzien und Testkits für verschiedene Enterovirus-Direktnachweisverfahren

1.1 Bereitstellung der Antikörper gegen Enteroviren

Wie oben beschrieben, eignen sich für das erfindungsgemäße Verfahren und den erfindungsgemäßen Kit sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper. Geeignete monoklonale Antikörper sind auch kommerziell erhältlich, beispielsweise von der Firma Chemikon, Temecula, USA. Sie können in gereinigter Form oder auch als Rohprodukt (Maus-Ascites) bezogen werden. Bei der Verwendung des aus Kostengründen bevorzugten Maus-Ascites ist eine Aufreinigung, beispielsweise wie im folgenden unter 1.3 beschrieben, erforderlich. Geeignete polyklonale Antikörper werden beispielsweise durch die Immunisierung von Kaninchen (1.2) mit anschließender Aufreinigung (1.3) gewonnen.

1.2 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen Enteroviren

Für die Immunisierung von Kaninchen wurde eine Mischung verschiedener Enterovirusstämme verwendet. Die Vermehrung der Viren erfolgte in Verozellen. Die Beimpfung der Kulturen erfolgte mit einer Virusdosis von 3×10^5 TCID₅₀ (tissue culture infective dose 50%) pro 175 cm² Zellkulturflasche. Nach Auftreten eines 100% zytopathischen Effekts wurden die Viren geerntet. Infizierte Zellen wurden pelletiert und in 5 ml TE Puffer (0,01 M Tris, 1 mM EDTA, 2% Nonidet P-40, pH 7,4) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde im Eisbad mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen und anschließend zweimal bei 4500 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand weiter bearbeitet. Der Mediumüberstand aus den Zellkulturflaschen wurde mit Hilfe der Ultrafiltration auf ca. 80 ml eingengt und bei 4500 U/min 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in einer Ultrazentrifuge 50 Minuten bei 30 000 U/min in einem 45 TI-Rotor pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml TE-Puffer aufgenommen, resuspendiert und mit dem Virusüberstand aus den aufgeschlossenen Zellen vereinigt.

Das konzentrierte Virus wurde auf ein 30% Sucrosekissen aufgetragen und im 45 TI-Rotor für 60 Minuten bei 35 000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS (Phosphat-gepufferte Saline) aufgenommen. Das gereinigte Virus wurde mittels UV-Strahlung inaktiviert und lyophilisiert. Die Proteinbestimmung in den Präparationen wurde mit Hilfe des Micro BCA-Protein-Assays der Firma Pierce, Rockford, USA durchgeführt.

Drei Kaninchen wurde in Intervallen von 2 Wochen viermal subkutan (100 µg Protein/Injektion) immunisiert und der Titer bestimmt.

1.3 Reinigung von Antikörpern

5 ml Kaninchen-Serum oder ggf. 1 ml Maus-Ascites wurden 1 : 5 in PBS verdünnt und durch eine 0,2 µm-Millipore-Membran filtriert. HiTrap-Protein-A-Säulen (Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurden mit PBS (3 × Säulenvolumen) gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte mit 0,1 M Zitronensäure pH 3. Die 0,5 ml Fraktionen wurden in Röhrchen gesammelt und der pH mit 50 µl Karbonatpuffer (pH 11) auf einen neutralen Wert eingestellt. In allen Fraktionen wurde der Proteingehalt bestimmt (Micro BCA-Protein Assay, Pierce). Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden gepoolt.

1.4 Beschichtung von Festphasen zum Antigen-Nachweis

Für die Beschichtung wurden nach 1.3 gereinigte Antikörper verwendet.

1.4.1 Polysorb-Platten (z. B. Firma Nunc, Roskilde, Dänemark)

100 µl Antikörper-Lösung (5 µg/ml) in Karbonat Puffer (0,05 M, pH 9,6) wurden in jede Kavität pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden mit PBS gewaschen, mit 1% BSA (Rinderserum-Albumin) blockiert, der Überstand anschließend entfernt und getrocknet.

1.4.2 Kovalente Bindung auf Platte mit Hydrazid Oberfläche (z. B. Firma Corning Costar, Bodenheim, Deutschland)

Perjodat-Aktivierung: Die Antikörper (1 µg/ml) wurden in 10 ml 10 mM Natrium-Acetat Puffer pH 4,0 verdünnt. Zu dieser Lösung wurden 32 mg NaJO₄ zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Beschichtung: Die Lösung mit perjodat-aktivierten Antikörpern (100 µl/Vertiefung (well)) wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden mit PBS gewaschen, mit 1% BSA blockiert, der Überstand entfernt und getrocknet.

1.4.3 Reacti-Bind™ Protein G beschichtete Platten (Firma Pierce, USA)

Antikörper-Lösung (100 µl, 1 µg/ml) in SuperBlock/Tween-Puffer (Pierce) wurde in Kavitäten pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen.

1.4.4 Membranen für die Immunchromatographie

Für den Test wurden kommerziell erhältliche Streifen zur Beschichtung verwendet (z. B. Firma Advanced Microdevices MDI, Ambala Cantt, Indien).

Auf die Nitrozellulosemembran wurden anti-Enterovirus-Antikörper (5 µg/ml) mit Hilfe eines Feder-Schreibers aufgetragen.

Ca. 0,5 cm oberhalb dieser ersten Bande wurden Ziegen anti-Maus IgG Antikörper (z. B. Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, 5 µg/ml) aufgetragen. Die Nitrozellulosemembran wurde mit 1% BSA in 0,01 M Tris/HCl Puffer pH 7,6 geblockt und anschließend luftgetrocknet.

1.5 Markierung der Antikörper

1.5.1 Biotinylierung

1 ml gereinigte Antikörper (2 mg/ml) wurden gegen 50

mM Natriumbicarbonat-Puffer pH 8,5 in Slide-A-Lyser™ Dialysekassetten (Pierce) dialysiert. Sulfo-NHS Biotin (74 µl, Pierce) wurde zu der Antikörper-Lösung gegeben und auf Eis inkubiert. Nichtgebundenes Biotin wurde durch Dialyse entfernt.

1.5.2 Markierung mit Peroxidase nach der Perjodat-Methode

2 mg Meerrettich-Peroxidase wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Zugabe von 100 µl 0,1 M Natriumperjodat wurde die Lösung 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und gegen 1 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,4 über Nacht dialysiert. 0,5 ml Antikörper (2 mg/ml) wurden gegen 10 mM Natriumbicarbonat-Puffer dialysiert. Der pH-Wert der Peroxidase-Lösung wurde durch Zugabe 10 µl 0,2 M Natriumkarbonat-Puffer pH 9,5 auf 9,0 eingestellt. Die beiden Lösungen wurden gemischt und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden 50 µl Natriumborhydrid-Lösung (4 mg/ml) dazugegeben und weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

1.5.3. Goldmarkierung

100 ml der Antikörper-Lösung wurden gegen 2 mM Borax pH 9,0 dialysiert. Danach wurden die Antikörper 1 Stunde bei 100 000 × g pelletiert. Die Markierung erfolgte mit 5 nm kolloidalem Gold (Firma British BioCell International, Cardiff, Großbritannien). 50 ml Gold-Sol wurden mit 100 mM K₂CO₃ auf pH 9,0 eingestellt und 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde 5 ml 10% BSA in 2 mM Borax pH 9,0 dazugegeben. Die Gold-konjugierten Antikörper wurden durch 1-stündige Zentrifugation bei 45 000 × g von den nicht-konjugierten Antikörpern und den freien Gold-Partikeln getrennt. Das Pellet wurde in 1 ml Tris/HCl Puffer (pH 8,2 mit 1% BSA und 1% NaN₃) resuspendiert und auf einen 10–30% Glycerol-Gradienten aufgetragen, der ebenfalls in Tris/HCl-Puffer (pH 8,2 mit 1% BSA und 1% NaN₃) hergestellt wurde. Nach der Zentrifugation (125 000 × g, 1 h) wurden die Fraktionen mit Gold-markierten IgG mit Tris/HCl-Puffer (pH 8,2 mit 1% BSA und 1% NaN₃) zur optischen Dichte 3,0 bei 530 nm verdünnt und mit 20% Glycerin eingefroren.

2. Durchführung eines qualitativen erfindungsgemäßen Enterovirus-Nachweises an Mikrotiterplatten

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens zum Nachweis enteroviraler Antigene werden 96-Loch Mikrotiterplatten eingesetzt, auf denen die gereinigten Antikörper fixiert sind.

Klinische Proben wurden in Verdünnungspuffer (VP) verdünnt. Rachen- und Rektal-Abstriche wurden in ca. 1,5 ml Puffer aufgenommen. Liquore wurden 1 : 2 verdünnt. Stuhlproben wurden mit VP zu 30%igen Suspensionen verarbeitet und schwere Bestandteile bei 1000 × g abzentrifugiert. Die Überstände wurden zur Untersuchung verwendet. Als negative Kontrollen wurden Materialien von Patienten ohne Enterovirusinfektion verwendet. Als Positivkontrolle diente negatives Patientenmaterial, das mit gereinigten Enteroviren aus Zellkulturüberständen verunreinigt worden war. In die mit Antikörper beschichteten Platten wurden je 100 µl Positiv- und Negativkontrolle und 100 µl der zu testenden Proben einpipettiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit verdünntem markiertem Antikörper (1 : 500 in VP, 100 µl/Vertiefung, 1 Stunde bei 37°C). Nach erneutem Waschen bei Verwendung von Peroxidase-markierten Antikörpern

erfolgte die Zugabe von Substrat (TMB, Tetramethylbenzidin). Bei Verwendung von biotinylierten Antikörpern erfolgte noch eine Inkubation (0,5 Stunden, 37°C) mit 100 µl Peroxidase-markiertem Streptavidin (z. B. Sigma-Aldrich) und danach die Zugabe von Substrat (TMB). Nach 10 Minuten wurde die Reaktion mit 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden als positiv bewertet, wenn die Absorption der getesteten Proben mindestens den 2-fachen Wert der Absorption der negativen Kontrolle erreichte.

3. Erfindungsgemäßer Dip Stick-Schnelltest

Die Vorbereitung der klinischen Proben erfolgte wie oben unter 2. beschrieben. Das untere Ende des Test-Sticks wurde in eine zu testende Probe eingetaucht. Im positiven Fall erscheinen auf dem Stick zwei violett gefärbte Linien, im negativen Fall nur eine (Funktionskontrolle).

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis enteroviraler Antigene, wobei das Antigen von mindestens einem ersten, immobilisierten, gegen mindestens eine gruppenspezifische Determinante von Enteroviren gerichteten Antikörper unter Ausbildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes gebunden und unter Bindung weiterer Antikörper detektiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der immobilisierte Antikörper monoklonal ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der immobilisierte Antikörper ein Gemisch verschiedener monoklonaler Antikörper darstellt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der immobilisierte Antikörper polyklonalen Ursprungs ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion durch Markierung eines an den Antikörper-Antigen-Komplex bindenden zweiten Antikörpers erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion durch Markierung eines dritten Antikörpers erfolgt, welcher gegen einen an den Antigen-Antikörper-Komplex bindenden Antikörper gerichtet ist.
7. Kit zum Nachweis enteroviraler Antigene, umfassend mindestens einen Antikörper (2, 19), welcher gegen mindestens eine gruppenspezifische Determinante von Enteroviren gerichtet ist.
8. Kit nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper an einer Festphase (1) immobilisiert ist.
9. Kit nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper monoklonal ist.
10. Kit nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein Gemisch aus verschiedenen monoklonalen Antikörpern darstellt.
11. Kit nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper polyklonalen Ursprungs ist.
12. Kit nach einem der Ansprüche 7 bis 11, umfassend einen weiteren, gegen mindestens eine Determinante, vorzugsweise gruppenspezifische Determinante von Enteroviren gerichteten zweiten Antikörper (4, 16), der markiert ist.
13. Kit nach einem der Ansprüche 7 bis 11, umfassend einen weiteren, gegen mindestens eine, vorzugsweise gruppenspezifische Determinante von Enteroviren gerichteten zweiten Antikörper sowie einen dritten Antikörper, welcher gegen den zweiten Antikörper gerichtet

tet und markiert ist.

14. Kit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite Antikörper ebenfalls markiert ist.

15. Kit nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die markierten Antikörper mit Biotin, mit Enzym oder mit kolloidalem Gold markiert sind. 5

16. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphase eine Mikrotiterplatte ist. 10

17. Kit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Mikrotiterplatte um eine adsorbierende Platte handelt.

18. Kit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Mikrotiterplatte um eine kovalent bindende und/oder eine mit Protein A/G beschichtete Platte handelt. 15

19. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphase eine Membran, insbesondere für die Immunochromatographie, ist. 20

20. Kit nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran Teil eines Teststreifens (Dip Stick) (**11**) ist.

21. Kit nach einem der Ansprüche 7 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß eine Funktionskontrolle (**18**) vorgesehen ist. 25

22. Kit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Funktionskontrolle (**18**) mindestens einen immobilisierten Antikörper (**20**) umfaßt, der andere Antikörper (**16**) bindet, welche gegen mindestens eine Determinante, vorzugsweise gruppenspezifische Determinante von Enteroviren gerichtet sind. 30

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

35

40

45

50

55

60

65

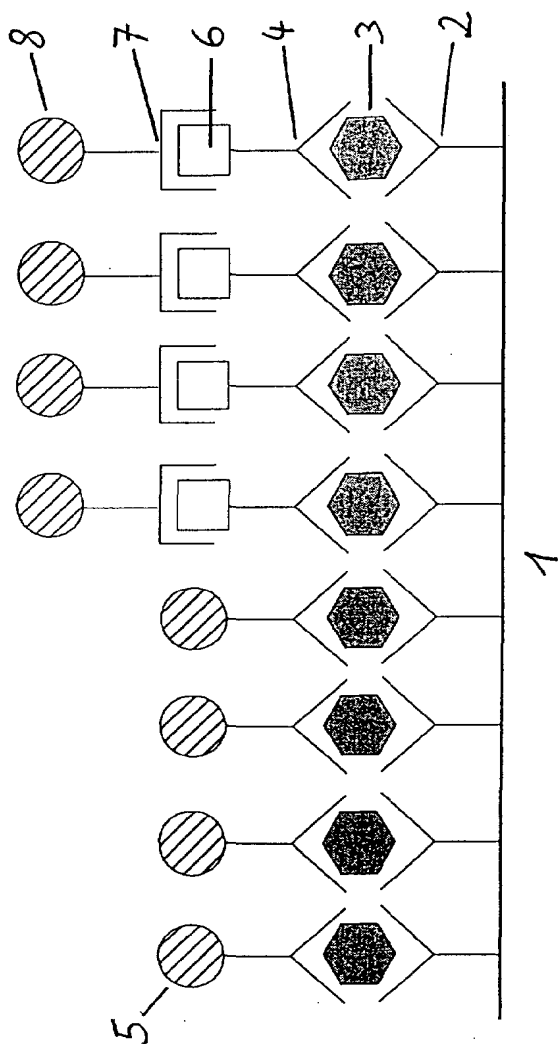


Fig. 1

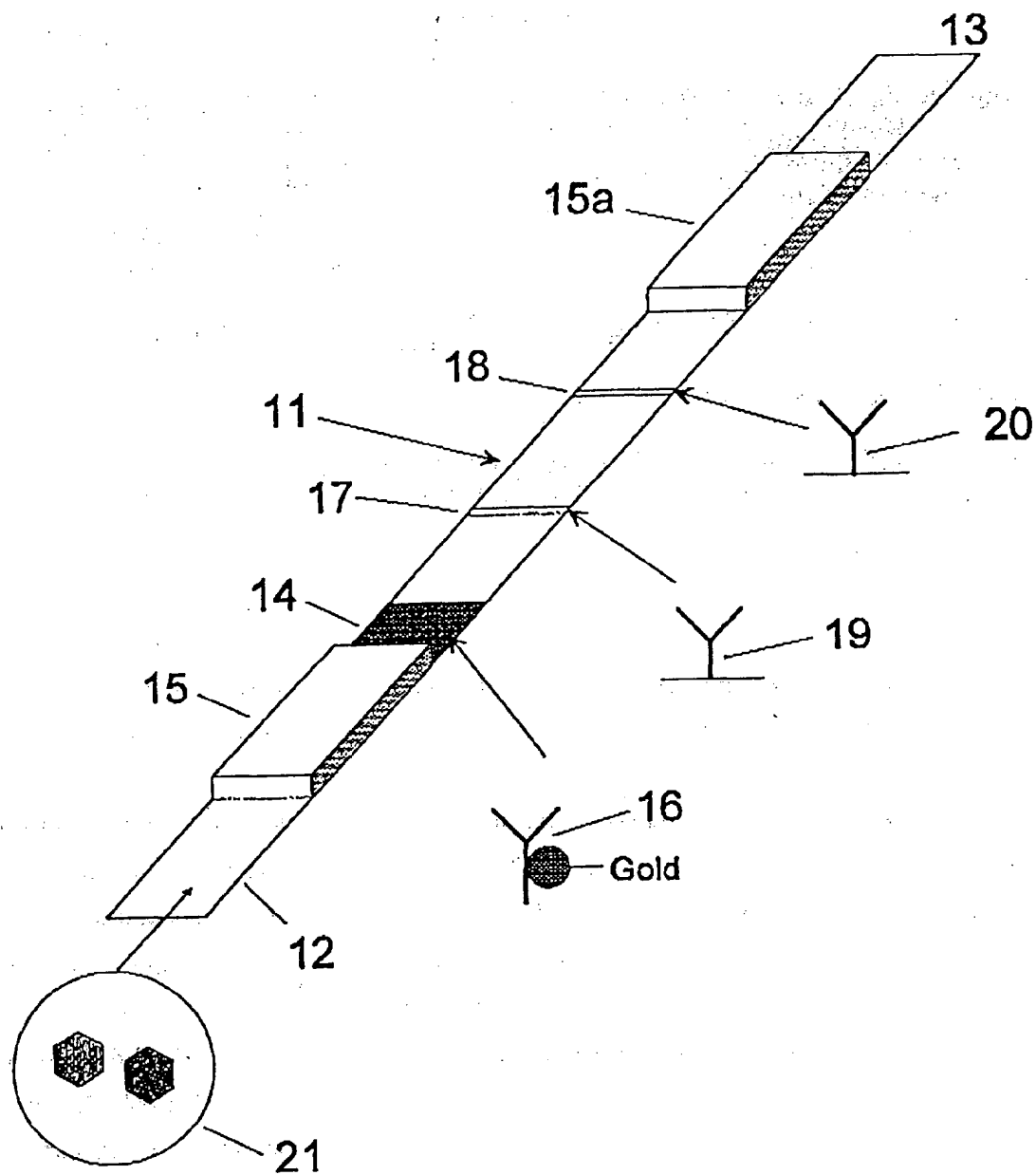


Fig. 2